

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018677 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/46, C12N 5/10, C12Q 1/02, 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010434
- (22) 国際出願日: 2003年8月19日 (19.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-241487 2002年8月22日 (22.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 清末 優子 (KIYOSUE, Yuko) [JP/JP]; 〒604-8822 京都府京都市中京区壬生辻町3-1-1 ライオンズマンション四條大宮1111 Kyoto (JP). 佐々木 博之 (SASAKI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒247-0008 神奈川県横浜市栄区本郷台二丁目24番13号 Kanagawa (JP). 月田 承一郎 (TSUKITA, Shoichiro) [JP/JP]; 〒604-0811 京都府京都市中京区堺町通二条上ル亀屋町167 グランフォルム京都御所南502 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CULTURED *XENOPUS* CELL LINE EXPRESSING MUTATED APC

(54) 発明の名称: 変異型APC発現アフリカツメガエル培養細胞株

(57) Abstract: Using a technique of visualizing a protein, a cell line stably expressing full-length GFP-fusion and mutated APC in *Xenopus* kidney epithelial culture cells A6 is obtained. Using these cells, it is found out that the mutated APC lacking the C-terminal region induces multi-layering of cells. It is further confirmed that the multi-layered cells in the mutated APC-expressing cell line sustains an intercellular adhesion structure, i.e., a phenomenon similar to the polyp formation in an individual (mouse).

(57) 要約: 蛋白質を可視化する技術を用い、アフリカツメガエル腎臓上皮培養細胞A6において、GFP融合全長及び変異型APCを安定に発現する細胞株を得た。この細胞を用い、C末端領域を欠損した変異型APCは細胞の重層化を誘導することを見出した。さらに、変異型APCの発現細胞株によって重層化した細胞は、細胞間接着構造を保持しており、個体 (マウス) におけるポリープ形成と類似した現象であることを確認した。

WO 2004/018677 A1

-1-

## 明細書

## 変異型 APC 発現アフリカツメガエル培養細胞株

5 技術分野

本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC タンパク質、および該タンパク質を発現する細胞に関する。

背景技術

- 10     *adenomatous polyposis coli* (APC) 遺伝子は、家族性大腸腺腫症 (FAP) の原因遺伝子として同定された癌抑制遺伝子であるが、APC 遺伝子の変異は FAP に限らず非遺伝性の大腸腺腫や大腸癌の発生に関与していることが明らかにされている (Polakis, P., *Biochim Biophys Acta*. (1997) 1332, F127-147)。FAP 患者では大腸に多数の良性ポリープを形成し、
- 15     その中から悪性化した癌細胞が出現する。大腸癌は、多数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子に多段階的に変異が起きて発症するが、APC 遺伝子の変異は最も早期に発見されており、APC 遺伝子の異常が大腸癌発症の原因と考えられている。

- APC タンパク質 (以下、APC) は、2843 アミノ酸からなる分子量約 310kDa
- 20     の大きなタンパク質で、多数のタンパク質と結合する。これまでに、脱リン酸化酵素 PP2A B56 サブユニット、APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor (Asef)、キネシンファミリーに属する微小管関連モータータンパク質 KAP3/KIF3A/KIF3B 複合体、Wnt シグナル伝達系構成因子である  $\beta$ -catnein/GSK-3 $\beta$ /Axin、細胞骨格成分である微小管、
- 25     微小管結合タンパク質 EB/RP ファミリー・タンパク質、細胞周期調節因子 p34<sup>cdc2</sup> リン酸化酵素、アポトーシス関連タンパク質 Siah-1、癌抑制遺

-2-

伝子産物 hDLG と直接結合することが報告されている (for review see Bienz, M., Nat Rev Mol Cell Biol. (2002) 3(5), 328-338.)。FAP 患者のポリープ及び大腸癌細胞では、APC の対立遺伝子の両方に変異が生じており、途中で切断されて C 末端領域を欠失した変異型 APC のみが発

5 現されている。この変異型 APC が異常な機能を有することにより、細胞が癌化すると考えられている。

APC は  $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$ /Axin と複合体を形成して  $\beta$ -catenin の分解を促進し、その存在量を低く維持する機能があることが報告されている (Rubinfeld, B, Science (1993) 262:1731-1734, Su, L. K., Science

10 (1993) 262:1734-1737)。 $\beta$ -catenin が多量に存在すると、核に移行して転写因子と結合し細胞増殖を促進するため、当初、APC は  $\beta$ -catenin の存在量を制御することで癌抑制タンパク質として機能していると考えられた。しかしながら、FAP モデルマウスを用いたポリープ形成過程の詳細な観察から、crypt で分化した上皮細胞が villus 先端方向に正常に

15 移動できず、crypt-villus の境界域において villus の内側に落ち込み本来とは異なる形態となることによってポリープを形成することが明らかにされた (Oshima, M., et al., Cancer Res. (1997) 57(9), 1644-1649.)。さらに、ポリープ内では細胞増殖の促進は起こっておらず、上皮細胞としての細胞間接着構造を維持しつつ本来とは異なる形態をとることがポ

20 リープ形成の原因であることが明らかにされ、APC が細胞形態や運動の制御に関与していると考えられるようになってきた。さらに、APC が、アクチン細胞骨格の制御機能を持つ Asef (Kawaki, Y., et. al. Science (2000) 289(5482), 1194-1197.) や、運動する細胞の先端端で微小管と結合することが見出され (Mimori-Kiyosue, Y. et. al., J Cell Biol.

25 (2000) 148(3), 505-518.)、APC が細胞骨格の制御に関わっている可能性が考えられ始めている。

正常及び変異型 APC の細胞形態や運動に関わる機能を明らかにし、ポリープ形成及び癌化の原因の解明が待望されていた。

### 発明の開示

- 5      本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、正常および変異型 APC の細胞形態や運動に関わる機能を明らかにすることにある。さらに本発明は、得られた知見を基に変異型 APC タンパク質の用途を提供することにある。

- 10      本発明者らは、APC の機能を詳細に明らかにするために、自家蛍光タンパク質 (GFP ; green fluorescent protein) を標識した全長及び切断型 APC を上皮細胞に発現させた。融合タンパク質 cDNA を細胞に導入し、薬剤耐性を利用して融合タンパク質を安定的に発現する独立な (independent) クローンを数株ずつ単離したところ、異なる構造の切断型 APC 発現細胞を発現するそれぞれのクローンにおいて共通して、細胞
- 15      層の隆起が観察された。電子顕微鏡観察において、細胞間接着構造 (AJ、TJ) は形成しているが、細胞間隙及び細胞-基質間隙が増加して細胞接着が弱化し、細胞が重層化していることが認められた。全長 APC を発現する細胞株では、細胞の重層化は起こらず、細胞接着はより強化された。免疫組織染色によって、重層化した細胞群は細胞間接着構造を保持して
- 20      いることが確認された。以上の結果より、変異型 APC は細胞の重層化を引き起こすことを見出し、本発明を完成するに至った。変異型 APC を発現する細胞は、細胞間接着構造を保持しているが細胞の重層化を引き起こすという現象は、本発明者らによって始めて見出された知見である。

- 25      本発明の変異型 APC は、正常上皮細胞の単層性を阻害し、細胞間接着を維持させながら細胞を重層させることから、本発明の変異型 APC を発現する細胞は、ポリープ形成現象のモデル細胞として有用である。さら

-4-

に、本発明の変異型 APC を発現する細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに利用することが可能である。

即ち本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC タンパク質、および該タンパク質を発現する細胞、並びに該細胞の用途に関し、より

5 具体的には、

〔1〕 細胞の重層化を誘導し得る機能を有することを特徴とする変異型 APC タンパク質、

〔2〕 APC タンパク質の少なくとも以下の (a) ～ (c) のいずれかのアミノ酸領域が欠損した、〔1〕に記載の変異型 APC タンパク質、

10 (a) 配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、2827 位のアミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域

(b) 配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、2159 位のアミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域

15 (c) 配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、860 位のアミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域

〔3〕 アフリカツメガエル由来である、〔1〕または〔2〕に記載の変異型 APC タンパク質、

〔4〕 〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の変異型 APC タンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC タンパク質、

〔5〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の変異型 APC タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

〔6〕 〔5〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

25 〔7〕 人為的に発現させた〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の変異型 APC タンパク質または〔6〕に記載のベクターを有する細胞、

〔 8 〕 哺乳動物由来である、〔 7 〕 に記載の細胞、

〔 9 〕 アフリカツメガエル由来である、〔 7 〕 に記載の細胞、

〔 1 0 〕 樹立された細胞株である、〔 7 〕 ～〔 9 〕 のいずれかに記載の細胞、

5 〔 1 1 〕 以下の工程（ a ） ～（ c ） を含む、細胞の重層化阻害剤の候補化合物のスクリーニング方法、

（ a ） 〔 7 〕 ～〔 9 〕 のいずれかに記載の細胞と被検化合物を接触させる工程、

（ b ） 上記細胞の重層化を検出する工程、

10 （ c ） 重層化を阻害する化合物を選択する工程、

〔 1 2 〕 以下の工程（ a ） ～（ d ） を含む、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC 蛋白質をコードするポリヌクレオチドをスクリーニングする方法、

（ a ） アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異型 APC 蛋白質を発現させる工程、

（ b ） 上記細胞を培養する工程、

（ c ） 上記細胞の重層化を検出する工程、

（ d ） 上記細胞を重層化させるポリヌクレオチドを選択する工程を、提供するものである。

20 本発明は、変異型 APC タンパク質（本明細書においては「変異型 APC」と略記する場合あり）を提供する。細胞において本発明の変異型 APC が発現することにより、細胞の重層化が誘導される。本発明の変異型 APC は、本発明者らによって細胞間接着を維持しながら細胞の重層化を誘因するタンパク質として特定されたものである。

25 本発明において「変異型」とは、正常 APC タンパク質のアミノ酸配列において、単一または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加または挿入さ

-6-

れたタンパク質を指す。また、上記「変異」は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的変異であってもよく、あるいは非保存的置換を伴う変異であってもよい。つまり、本発明の変異型 APC は、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するものであれば、その

5 変異の種類は特に制限されない。本発明における変異型 APC は、通常、人為的に作製（もしくは正常 APC を基に改変）、あるいは単離・精製されたものである。

また、APC タンパク質は、これまでのところ種々の生物において見出されている。これらの正常 APC タンパク質のアミノ酸配列は、公共のデータベースから容易に入手することができる。例えば、ヒトの APC タン

10 パク質のアミノ酸配列の GenBank のアクセッション番号は M74088 であり、アフリカツメガエルの APC タンパク質のアミノ酸配列はの GenBank のアクセッション番号は U64442 である。アフリカツメガエルの APC タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：1 に記載する。

15 本発明の変異型 APC は、特定の種 of APC の変異体に限定されない。本発明の変異型 APC の一例としては、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるアフリカツメガエルの APC タンパク質の変異体を挙げることができる。

本発明の好ましい態様においては、変異型 APC は、正常 APC の一部の

20 アミノ酸領域が欠失されたタンパク質（切断型 APC タンパク質）である。

本発明の変異型 APC は、通常、C 末端の 3 つのアミノ酸 TSV 配列（DLG 結合領域）を欠失したものである。この TSV 配列は、PDZ タンパク質結合モチーフとされており、この領域で PDZ タンパク質の一つ hDLG タンパク質と結合することが報告されている（Matsumine A, et al., Science

25 (1996); 272 (5264): 1020-3）。また、本発明の変異型 APC は、少なくとも「ヘプタッド・リピート」及び「アルマジロ・リピート」を含む N 末端

アミノ酸領域を有することが好ましいが、本発明の変異型 APC は、これらのリピートを含むものに限定されない。

具体的には本発明の変異型 APC として、下記の (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸領域が少なくとも欠損した構造を有するタンパク質を挙げることができる。

(a) C 末端の TSV 配列 (DLG 結合領域)、より具体的には、配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、2827 位のアミノ酸以降の C 末側アミノ酸領域

10 (b) C 末端側の塩基性領域 (basic region) および TSV 配列、より具体的には、配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、2159 位のアミノ酸以降の C 末側アミノ酸領域

15 (c) 15 アミノ酸リピート (15a. a. repeats)、20 アミノ酸リピート (20a. a. repeats)、C 末端側の塩基性領域 (basic region) および TSV 配列、より具体的には、配列番号：1 に記載の APC タンパク質において、860 位  
15 のアミノ酸以降の C 末側アミノ酸領域

また、上記のタンパク質において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものであって、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するタンパク質もまた、本発明に含まれる。このタンパク質を調製するための方法としては、例えば、ハイブリダイ  
20 ザーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) を利用して、上記変異型 APC をコードする DNA 配列またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA  
25 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明のタンパク質を得ることは、通常行いうることである。このように単離され



たタンパク質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされるタンパク質であって、細胞の重層化を誘導し得る機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

変異型 APC において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは  
5 は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA を単離するためのストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハ  
10 イブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）  
15 を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA によってコードされるポリペプチドは、通常、本発明の変異型 APC とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも  
20 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは少なくとも 95% 以上、さらに好ましくは少なくとも 97% 以上（例えば、98～99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc.  
25 Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTX と呼ばれるプログラムが開

発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTX  
によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば  
score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラム  
を用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

5 これらの解析方法の具体的な手法は公知である  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

本発明において、「細胞の重層化」とは、例えば、以下のような細胞  
の状態（形態）であるものと、記述することができるが、通常、正確に  
定義することは困難であるため、下記の状態に特に制限されるものでは  
10 ない。

(a) 異なる細胞の核が高さ方向に複数重なって観察される。

(b) 細胞体が、細胞層から遊離せず、単層状態の細胞（例えば、A6 細胞）  
の平均的な高さ（2-4  $\mu$ m）よりも明らかに高い位置に存在する。

(c) 電子顕微鏡レベルでは明らかに細胞体や細胞核が高さ方向に複数  
15 存在して見られる領域は、光学顕微鏡レベル（位相差顕微鏡法）では細胞  
単層に”しわ”が寄りうねったように観察される。

本発明において、細胞の重層化を誘導し得るタンパク質であるか否かは、  
当業者においては公知の方法により判定することができる。例えば、  
対象となるタンパク質を発現する細胞について、位相差顕微鏡または蛍  
20 光抗体法によって、細胞が重層化されているか否かを容易に確認する  
ことができる。

本発明の変異型 APC は、例えば、正常 APC タンパク質をコードする DNA  
の塩基配列を基に、当業者においては、一般的に周知の方法（PCR 法等）  
を利用して作製することができる。例えば、上記の変異型 APC タンパク  
25 質の作製は、通常、該タンパク質をコードする DNA を正常 APC の cDNA  
またはゲノム DNA を鋳型とする PCR 法により増幅し、該 DNA を発現ベク

ターヘクローニングすることによって実施することができる。正常 APC の cDNA は、当業者においては公知の方法、例えば、正常 APC を発現している細胞より cDNA ライブラリーを作製し、APC cDNA の一部をプローブとするハイブリダイゼーションを行うことにより取得することができる。

- 5 cDNA ライブラリーは、例えば、文献 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。

- 上記変異型 APC は、より具体的には、後述の実施例で示す方法により作製することができる。当業者においては、後述の実施例に示す方法を  
10 適宜改変して、正常 APC の任意のアミノ酸領域を有する変異型 APC を作製することが可能である。

- また、本発明の変異型 APC は、正常 APC タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列）を改変することによって作製することができる。例えば、アミノ酸配列の改変は、部位特異的変異  
15 誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)) 等の周知の方法により正常 APC タンパク質をコードする DNA の塩基配列を改変し、塩基配列が改変された DNA を適当な細胞において発現させることにより行うことができる。タンパク質中のアミノ酸の変異は、自然界（天然）にお  
20 いて生じることもあり、本発明のタンパク質には、細胞間接着を維持しながら細胞の重層化を誘導し得る機能を有する限り、単離された天然の APC タンパク質変異体も含まれるが、通常、本発明の変異型 APC は人為的に作出されたものである。

- 本発明の変異型 APC は、当業者に公知の方法により、組み換えポリペ  
25 プチドとして調製することが可能である。組み換えポリペプチドは例えば、本発明の変異型 APC をコードする DNA を、適当な発現ベクターに組

み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明の変異体に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより調製(精製)することが可能である。

また、本発明の変異型 APC をグルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質との融合ポリペプチドとして、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えポリペプチドとして宿主細胞(例えば、動物細胞や大腸菌など)内で発現させた場合には、発現させた組み換えポリペプチドはグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合ポリペプチドの精製後、必要に応じて融合ポリペプチドのうち、目的の変異体以外の領域を、トロンピンまたはファクター Xa などにより切断し、除去することも可能である。

また、本発明の変異型 APC をコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。該ポリヌクレオチドには、本発明の変異型 APC をコードする DNA、および該 DNA の転写産物である RNA が含まれる。

さらに本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターは、細胞において本発明の変異型 APC を発現させるため、あるいは、本発明の変異型 APC を生産させるために有用である。

上記ベクターは、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1Blue)などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子(例えば、適当な薬剤(アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコールにより選択できるような薬剤耐性遺伝子)を有するものであれば特に制限されない。ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、

-12-

pBluescript、pCR-Script 等が挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とする場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 等が挙げられる。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を有する以外に、宿主を JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、 araB プロモーター (Better ら, Science (1988) 240, 1041-1043) 、または T7 プロモーター等を有することが望ましい。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (ファルマシア社製) 、「QIAexpress system」 (キアゲン社製) 、pEGFP、または pET (この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい) 等が挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明の変異型 APC を発現させるためのベクターとして、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322) 、pEF、pCDM8) 、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」 (ギブコ BRL 社製) 、pBacPAK8) 、植物由来の発現ベクター (例えば pMH1、pMH2) 、動物ウィルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw) 、レトロウィルス由来の発

現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした  
5 場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40  
プロモーター（Mulligan ら、Nature (1979) 277, 108）、MMLV-LTR プロ  
モーター、EF1 $\alpha$  プロモーター（Mizushima ら、Nucleic Acids Res. (1990)  
18, 5322）、CMV プロモーター等を有することが望ましく、細胞への形  
質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418 な  
10 ど）により選択できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好まし  
い。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、  
pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等が挙げられる。

また、動物の生体内で本発明の変異型 APC を発現させる方法としては、  
本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、  
15 リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより  
生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとして  
は、例えば、アデノウイルスベクター（例えば pAdexlcw）やレトロウイル  
スベクター（例えば pZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限され  
ない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、  
20 常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning, 5. 61-5. 63）。  
生体内への投与は、*ex vivo* 法であっても、*in vivo* 法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された細胞を提供する。本  
発明の好ましい態様においては、該細胞は、人為的に本発明の変異型 APC  
を発現させた細胞（例えば、変異型 APC を人為的に導入し発現させた細  
25 胞）である。本発明のベクターが導入される細胞は特に制限されず、例  
えば、大腸菌や種々の動物細胞等を用いることが可能である。本発明の

好ましい態様においては、該細胞は本発明の変異型 APC の発現により、細胞間接着を維持しながら細胞の重層化が見られることを特徴とする上皮細胞である。本発明の細胞は、より好ましくは、本発明の変異型 APC を安定的に発現する樹立された細胞株である。また本発明の細胞は、好ましくは動物由来の細胞であり、より好ましくはアフリカツメガエル由来の細胞（例えば、A6 細胞）である。

本発明の変異型 APC を発現する細胞は、実際の APC 変異によるポリープ形成細胞と類似していると考えられる。家族性大腸腺腫症 (FAP) 患者の場合、初期段階において正常な細胞間接着を形成し、浸潤性を持たず、まだ悪性化していない良性のポリープを形成する。通常、このようなポリープが数百～数千形成され、これを切除せずに放置しておく、その中から APC 以外の遺伝子にも変異を生じることにより悪性化した細胞が出現し、この時点で癌化するものと考えられている。本発明の変異型 APC を発現する細胞は、APC のみの変異を模倣した状態であると言え、ポリープ形成または癌化の原因解明のための研究材料として有用である。

また、本発明の細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに有用である。本発明の変異型 APC を発現する細胞がアフリカツメガエル由来の細胞である場合には、該細胞は、室温、非二酸化炭素環境下で培養できる利点を有する。

本発明の細胞は、本発明の変異型 APC の製造や発現のための産生系として使用することができる。本発明の変異型 APC の製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、

CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル細胞、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO

5 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリポソーム DOTAP (ペーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフ  
10 エクション等の方法で行うことが可能である。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5  $\alpha$ 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌等が知られている。

15 これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりポリペプチドが得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養  
20 してもよい。

また、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に本発明の変異型 APC をコードする DNA を導入し、動物又は植物の体内で変異型 APC を産生させ、回収する。

25 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることがで



きる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。  
また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いること  
ができる。

例えば、本発明の変異型 APC をコードする DNA を、ヤギ  $\beta$  カゼインの  
5 ような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との  
融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片を  
ヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギか  
ら生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、  
本発明の変異型 APC を得ることができる。トランスジェニックヤギから  
10 産生されるポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモ  
ンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al.,  
Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを  
用いる場合、本発明の変異型 APC をコードする DNA を挿入したバキュロ  
15 ウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から該変  
異型 APC を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315,  
592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。  
タバコを用いる場合、本発明の変異型 APC をコードする DNA を植物発現  
20 用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリ  
ウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテ  
リアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバ  
カム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より本発明の変異  
型 APC を得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol.  
25 (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の変異型 APC は、宿主細胞内または細胞外

(培地など) から単離し、実質的に純粋で均一なポリペプチドとして精製することができる。ポリペプチドの分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、  
5 限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィー  
10 を用いて行うことができる。本発明には、これらの精製方法を用い、高度に精製された変異型 APC も含まれる。

一般的に、Wnt シグナル伝達系のアッセイとして、アフリカツメガエルの卵に Wnt シグナル因子の mRNA、抗体等を微量注入してその後の発生に与える影響を調べる方法が広く用いられている (Gloy J, et al., Nat  
20 Cell Biol (2002) 4(5):351-357)。APC や APC 結合タンパク質である  $\beta$ -catenin や axin もこの手法が用いられ、オタマジャクシの頭が双頭になったり頭が正常形成されなかったりする現象により、Wnt シグナル伝達系における機能が議論されている。従って、この種の実験において本発明の精製された変異型 APC を利用することも可能である。

25 また本発明は、細胞の重層化阻害剤のための候補化合物をスクリーニングする方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、(a) 本発

明の変異型 APC を発現する細胞と被験化合物を接触させる工程、(b) 該細胞の重層化を検出する工程、および(c) 重層化を阻害する化合物を選択する工程を含む。

5 本発明のスクリーニング方法に用いる被検化合物としては特に制限はなく、例えば、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清等が挙げられる。

10 上記工程(a)の「接触」は通常、本発明の変異型 APC を発現する細胞の培養液へ、被検化合物を添加することにより実施することができるが、この方法に特に制限されない。

上記工程(b)における「細胞の重層化の検出」は、当業者においては上述した方法(例えば、位相差顕微鏡を利用した方法等)により実施することができる。

15 上記工程(c)においては、通常、細胞へ被検化合物を接触させない場合と比較して、細胞の重層化の程度が低下している場合、細胞の重層化は阻害されていると判定される。

多くの癌細胞において細胞の重層化が見られることから、細胞の重層化を阻害する化合物は、抗腫瘍活性を有することが期待される。従って、本発明の上記スクリーニング方法によって選択される化合物は、抗腫瘍  
20 活性を有することが期待できる。即ち、該化合物を有効成分として含有する細胞の重層化阻害剤は、抗腫瘍剤となり得る。

また、従来の *in vitro* の培養細胞のシステムにおいては、癌タンパク質(oncoprotein) Ras や Src による”繊維芽細胞”のトランスフォーメーション(transformation)アッセイが広く用いられていた。これは、細胞  
25 胞が足場依存性を失って増殖を続けるために、何処にも接着していない細胞が増加して光学顕微鏡で検出し得る”focus”を形成する現象を見

るものである。Ras や Src、あるいはいくつかの癌遺伝子を上皮細胞に発現させると、ほとんどのケースで細胞間接着が失われ、さらに上皮の極性が失われて、繊維芽細胞・間充織細胞様の形態になることが知られている。本発明の細胞は、従来の細胞とは異なり、細胞間接着を維持したまま重層する細胞であることから、該細胞を利用した本発明の方法においては、従来の方法では取得するのが困難であった化合物（例えば、「上皮細胞の重層化」を特異的に阻害する化合物）のスクリーニングが可能となった。

多くの癌は上皮細胞由来であるのに関わらず、培養細胞を用いたアッセイ系は上述の繊維芽細胞を用いた”focus”形成アッセイが主なものであった。上皮細胞を用いたアッセイ系の開発は、多くの種類の癌細胞に対してより有効なスクリーニング系を提供する可能性がある。また、上皮細胞が単層を維持する機構を解明する材料としても有用である。

本発明には、上記スクリーニング方法によって取得される化合物、および該化合物を有効成分として含有する細胞の重層化阻害剤、あるいは抗腫瘍剤も含まれる。

本発明の上記薬剤は、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが可能である。

また本発明は、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC をコードするポリヌクレオチドをスクリーニングする方法に関する。該スクリーニング方法は、アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異型 APC 蛋白質を発現させる工程、上記細胞を培養する工程、

上記細胞の重層化を検出する工程、および上記細胞を重層化するポリヌクレオチドを選択する工程、を含む。

本発明の好ましい態様においては、被検者の APC をコードするポリヌクレオチドを被検試料とすることにより、該ポリヌクレオチドがポリマーの原因となるか否かについて検査することが可能である。通常、被検ポリヌクレオチドは、細胞において発現可能なように適当な発現ベクターへ組み込まれ、細胞へ導入される。当業者においては、適宜、発現ベクターを選択し、一般的な遺伝子工学技術を用いて、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築することができる。該発現ベクターの細胞への導入は、周知の方法、例えば、上述のエレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等により、実施することができる。

上記スクリーニング方法に使用されるアフリカツメガエル由来の細胞としては、例えば、A6 細胞を示すことができる。また、細胞の重層化は、例えば、位相差顕微鏡を利用した方法により検出することができる。より具体的には、後述の実施例で示す方法によって細胞の形態を詳細に観察することにより、細胞の重層化の検出を行うことができる。本スクリーニング方法においては、被検ポリヌクレオチドを発現させた細胞において重層化が見られる場合に、該ポリヌクレオチドは細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC をコードしているものと判定される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、アフリカツメガエル APC タンパク質のドメイン構成図と、本発明に用いられた GFP 融合全長及び変異型 APC を模式的に示す図である。

図 2 は、Parental A6 細胞、及び、GFP-fAPC、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP を安定に発現する A6 細胞株の位相差顕微鏡写真である。

図 3 は、変異型 APC を発現する細胞が重層化することを示す走査型電

子顕微鏡写真である。

図 4 は、変異型 APC を発現する細胞が重層化することを示す透過型電子顕微鏡写真である。

図 5 は、変異型 APC を発現する細胞が重層化後も細胞が細胞間接着構造を形成していることを示す写真である。抗 ZO-1 抗体で TJ タンパク質 ZO-1 を染色した。

図 6 は、非極性化状態の A6 細胞における、微小管非存在下での GFP-fAPC、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPc-GFP の局在を DLG の局在と共に示した蛍光顕微鏡写真である。GFP-fAPC はストライプ状に DLG と共局在するが（矢印）、GFP-APC ( $\Delta$ TSV) は細胞質中に散在し（矢頭）DLG と共局在しない。

図 7 は、Parental A6 細胞および GFP-fAPC、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPc-GFP 発現細胞の、撒き込み後一定時間後の細胞の面積を示すプロットである。左は nocodazole 非存在下、右は nocodazole 存在下で微小管を脱重合させた状態でアッセイした。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例に使用する抗体および細胞は下記の通りである。抗 ZO-1 モノクローナル抗体 (Clone:T8-754) と抗 DLG 抗体 (anti-PSD-95 Family, clone K28/86.2) は、それぞれ三光純薬と upstate biotechnology から購入した。核酸を選択的に染色する TOTO-3 とアクチン・フィラメントを選択的に染色するローダミン・ファロイジンは、Molecular probe 社から購入した。微小管を脱重合させる薬剤 nocodazole は SIGMA から購入した。A6 細胞（アフリカツメガエル *Xenopus laevis* 腎臓由来上皮細胞株）は、10% ウシ胎児血清を含む Leivobitz's L-15

培養液 (GIBCO BRL) 中にて、23℃、非二酸化炭素環境中で増殖させた。  
実施例 2 に示す理由により、アフリカツメガエルの遺伝子と細胞を選択した。

5    [実施例 1]    自家蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) 融合 APC の作成

APC の機能を詳細に明らかにするために、常法を用いて、APC の異なる部位を含む cDNA を自家蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) cDNA を融合した発現ベクターを作成した (図 1)。

10    アフリカツメガエル APC 遺伝子の配列は既知であり、GenBank (U64442) に報告されている。各々の発現ベクターは、以下の手順で作成された。

(a) GFP-fAPC:    GFP を融合した全長 APC を発現するためのベクターである。全長 APC を含む発現ベクター、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) 及び  
15    pQBI25/APC (1-8487) は、発明者らによって既に論文報告されている。GFP-fAPC 発現ベクターを構築するため、まず、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) から XbaI を用いて切り出した APC の 3' 領域を含む cDNA を、pEGFP-C1 (Clontech 社) の XbaI サイトに挿入した。次に、このベクターの SacII-BamHI サイトに、pQBI25/APC (1-8487) から  
20    SacII と BamHI によって切り出した cDNA を挿入した。最後に、このベクターの BamHI-NotI サイトに、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) から BamHI と NotI を用いて切り出した cDNA を挿入し、完全長 APC を含むベクターを構築した (APC/pEGFP-C1)。

25    (b) GFP-APC ( $\Delta$ TSV): APC の C 末端の 3 アミノ酸、TSV を欠失した APC を発現するベクターである。APC の 2089-2826 アミノ酸をコードする遺

-23-

伝子は、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) をテンプレートとし、以下のプライマーを用いて PCR により作成した。

CGACGCGTAATGCATTTTCTCCAGACTCTG (配列番号：2)

GGAATTCGGATCCTCACACCAGATAAGAACCAGAGTGCC (配列番号：3)

- 5 この PCR 産物は SpeI と EcoRI で切断し、pGFP-C (NheI) ベクターの NheI-EcoRI サイトに挿入した (APC (6475-8478) /pGFP-C (NheI))。このベクターを PvuI と NotI で切断し、得られた断片を同酵素で切断した APC/pEGFP-C1 に挿入した。

- 10 (c)  $\Delta$ cAPC-GFP：このタンパク質を発現するベクターは、既に発明者らによって論文報告されている。

(d) nAPC-GFP：APC の N 末端領域のみ (heptad 領域と armadillo 領域を含む) を発現するためのベクターである。APC の N 末端の 859 アミノ酸

15 をコードする遺伝子は、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) をテンプレートとし、以下のプライマーを用いて PCR により作成した。

CGACGCGTATGGCTGCTGCTTCGTATGATCAGT (配列番号：4)

CGACGCGTACCTGCTGTTCTTTCCCTGTC (配列番号：5)

- 20 この PCR 産物は MluI で切断し、pGFP (MluI) ベクター (発明者らにより報告) の MluI サイトに挿入した。

- (e) n2APC-GFP：APC の N 末端領域の coiled-coil heptad 領域のみを発現するためのベクターである。APC の N 末端の 284 アミノ酸をコードする遺伝子は、pGFP-C (NheI) /APC (1-8490) をテンプレートとし、以下のプ
- 25 ライマーを用いて PCR により作成した。

5' CTAGCTAGCATGGCTGCTGCTTCGTATG 3' (配列番号：6)



-24-

3' CCTGTCCCAAGTAGGTCACGATCGATC 5' (配列番号：7)

この PCR 産物は NheI で切断し、pQBI25 ベクターの NheI サイトに挿入した。

- 5 (f) mAPC-GFP: APC の中央領域のみを発現するためのベクターである。まず、以下のプライマーを用いて PCR により APC の 860-1120 アミノ酸をコードする遺伝子を作成した。

CTAGCTAGCCTCGGCAACTACCATTCG (配列番号：8)

ATTAGAGCTCACTCTAGAC (配列番号：9)

- 10 この PCR 産物を NheI と XbaI で切断し、pQBI25 ベクターの NheI サイトに挿入した。次に、このベクターを EcoRI で切断し、 $\Delta$ cAPC-GFP から EcoRI で切り出した APC の中央領域を含むフラグメントを挿入した。最後に、このベクターを HindIII と ApaI で切断し、 $\Delta$ cAPC-GFP から HindIII と ApaI で切り出したフラグメントを挿入した。

15

(g) GFP-cAPC : APC の C 末端領域のみを発現するためのベクターである。このタンパク質を発現するベクターは、既に発明者らによって論文報告されている (Mimori-Kiyosue et al., J. cell Biol., 148 (3):505-18, 2000)。

20

#### [実施例 2] cDNA の A6 細胞への導入及びスクリーニング

実施例 1 で得られたベクターを A6 細胞に導入して安定発現株の樹立を試みた。

- 25 多くの哺乳類由来培養細胞株において、APC の発現は非常に困難であり、これまでに全長 APC をコンディショナルに発現する細胞についての報告 (Mori P. J et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15) : 7950-4,

1996) はあるものの、外来の全長及び切断型 APC を安定的に発現する細胞株の樹立は報告されていない。そこで、A6 細胞が APC の発現に適當であるかどうかを検討した。

まず、pQBI25 ベクター (QBI0gene 社)、Effectene transfection 試薬 (Qiagen 社) を用いて GFP 単体を A6 細胞に発現させる予備実験を行い、  
5 蛍光染色像を蛍光顕微鏡で観察し、GFP が発現されることを確認した。  
さらに、GFP 以外の明瞭な蛍光シグナルを呈する細胞は、調べた限りにおいては存在しなかった。pQBI25 ベクター導入後 48 ~ 72 時間後に 0.6 ~ 0.8 mg/ml の G418 sulfate (Calbiochem 社) 存在下で培養を開始  
10 し、耐性クローンを選択したが、A6 細胞は容易に耐性クローンのコロニーを形成することが確認された。さらに、実施例 1 に示す発現ベクターを導入したところ、GFP の蛍光を発する細胞が増殖し得ることが確認された。これらの実験は、A6 細胞の通常の培養環境である、室温、非二酸化炭素環境中で行われた。これらの結果から、この細胞株が GFP 融合 APC  
15 を発現する蛋白質の視覚的スクリーニングに適當であるということを確認した。

実施例 1 に示した各 cDNA は、上記と同様の条件で細胞に導入し、蛍光顕微鏡下で GFP の蛍光を検出することによりスクリーニングを行った。各コンストラクトについて、安定的に発現する細胞株を樹立した。安定  
20 発現株樹立後、変異型 APC の発現状態は GFP の蛍光によって細胞に何ら操作を加えずに容易にモニターすることが可能であり、また、変異型 APC の細胞内局在も細胞が生きた状態で検出することが可能である。

[実施例 3] GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の位相差顕微鏡法  
25 による形態観察

実施例 2 で得られた GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の形態を、

-26-

位相差顕微鏡法により観察し、parental A6 細胞のそれと比較した。細胞が広く伸展した状態で 100%コンフルエント密度でディッシュに撒き、毎日培地を交換しながら 5 日以上、細胞が密になり上皮の構造に極性化するまで培養すると、parental A6 細胞と GFP-fAPC 発現細胞は上皮の形態を持つ平坦な単層構造となるが、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP 発現細胞では、一定の頻度で細胞層が平坦ではなく隆起した領域が出現した (図 2)。n2APC-GFP 発現細胞でも同様の隆起した領域が観察されたが、全ての株ではなく、細胞内に存在する GFP の蛍光強度が高い、即ち発現レベルが高い細胞に限られた。n2APC-GFP によって細胞を隆起させるためには、細胞の蛍光強度から測定して、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP のおよそ 10 倍の発現レベルが必要であった。

#### [実施例 4] GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の電子顕微鏡観察

実施例 2 で得られた GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の形態を詳細に観察するため、電子顕微鏡観察を行った (図 3)。各細胞を、リン酸緩衝液を用いて調整した 1%グルタルアルデヒド水溶液中で固定し、常法により試料作成を行い、走査型電子顕微鏡法により細胞表面の構造を観察した。parental A6 細胞と GFP-fAPC 発現細胞においては、細密充填された細胞の頂端膜が平坦に連なり、頂端膜上の微絨毛や primary cilia 構造の突出のみが観察された。それに対し、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP 発現細胞では、数個～数 10 個の細胞が隆起し、平坦な細胞単層でない領域の出現が観察された。

次に、1%グルタルアルデヒド水溶液中で固定した細胞を常法により超薄切片を作成、透過型電子顕微鏡法により細胞縦断面の観察を行った (図 4)。parental A6 細胞ではある程度の細胞間隙が認められるが細胞が単層であるのに対し、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP 発現

細胞では細胞間隙及び細胞-基質間隙が増加し、細胞の重層が明確に観察された。しかし、典型的な細胞間接着構造は保持されていることが確認された。つまり、変異型 APC 発現細胞は、電子顕微鏡像において、細胞頭頂領域に特徴的な細胞間接着構造であるタイト・ジャンクションとアドヘレンス・ジャンクションが観察されるのに関わらず、それより下の領域では細胞-細胞間隙が顕著で、また、細胞-基質間隙も顕著であった。それに反して、GFP-fAPC 発現細胞では、細胞-細胞間にも細胞-基質間にも間隙が全く見られず、細胞は単層に並列していた。これらの結果から、APC は細胞間接着を強化する機能を持つが、変異型 APC はその機能を有せず、おそらくドミナント・ネガティブに働くことによって細胞-細胞間、細胞-基質間の両方の接着が弱くなっていることが明らかになった。

つまり、全長 APC は、細胞-細胞間、細胞-基質間接着を強化する機能を持つのに対し、C 末端を欠失した変異型 APC ではその機能が失われ、かつドミナント・ネガティブな効果を及ぼすことによって、細胞が基質からはがれ、重層化するものと考えられた。

n2APC-GFP が細胞を重層化させるためになぜ高い発現レベルが必要であるのか（細胞重層化活性が低い）はまだ不明であるが、以下の 2 つの可能性が考えられた。1) APC はその N 末端の coiled-coil 領域でホモダイマーを形成することが報告されているが (Joslyn G, et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90 (23):11109-13.)、細胞中では n2PAC-GFP は内在性全長 APC とほとんど共局在できず、nAPC-GFP は APC と強く共局在することから、細胞内で安定して複合体を形成するためには armadillo リピート領域も必要であると考えられる。そのため、安定に内在性 APC と複合体形成できる変異体の方がドミナント・ネガティブ効果を発揮しやすい可能性。2) armadillo リピート部位にはアクチン骨格を調節する因子である Asef が結合して細胞運動を促進することが報告

-28-

されているため (Kawasaki Y, et. al., Science (2000) 289 (5482), 1194-1197)、ドミナント・ネガティブ効果と Asef による細胞運動の亢進の相乗効果により細胞接着や形態が変化した可能性。

5    [実施例 5]    GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の蛍光顕微鏡法による観察

実施例 2 で得られた GFP 融合全長及び切断型 APC 発現細胞の細胞間接着構造を、抗 ZO-1 抗体を用いて免疫染色を行い蛍光共焦点顕微鏡法により観察し、parental A6 細胞のそれと比較した (図 5)。ZO-1 は、上皮  
10    または内皮細胞層における細胞間接着装置の一つである tight junction (TJ) の構成成分であり、正常な上皮の極性を持った細胞では、ZO-1 は細胞膜頂端部において細胞を取り巻く連続した周縁に分布する。A6 細胞と GFP-fAPC 発現細胞では、ZO-1 は細胞周縁に連続して観察され、正常に上皮形態をとっていることが観察された。GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、  
15    nAPC-GFP 発現細胞では、重層していない領域の細胞で正常な ZO-1 の染色が確認された上、重層した領域においても、ZO-1 の連続したストランドが観察された。この結果は、GFP-APC ( $\Delta$ TSV)、 $\Delta$ cAPC-GFP、nAPC-GFP 発現細胞では細胞間接着 (TJ、AJ) は維持された状態で重層していることを示す。

20    これらの知見は、変異型 APC は細胞の形態に影響を及ぼし、正常上皮細胞の単層性を阻害することが示された。細胞間接着 (TJ、AJ) は維持しながら細胞が重層することから、モデルマウスにおけるポリープ形成現象に類似しており、モデル系として用いることができる。

25    [実施例 6]    全長 APC と変異型 APC の細胞内局在

GFP-fAPC は、極性化し上皮細胞形態をとる A6 細胞において

basolateral 膜とジャンクション領域に局在した。類似したコンストラクトである fAPC-mGFP (APC 全長を含むが GFP が APC の内部に挿入されている公表済みのコンストラクト) が A6 細胞において basolateral 膜に局在することは発明者らによって論文報告されている (Mimori-Kiyosue Y and Tsukita S., J Cell Biol, 154(6):1105-1109, 2001)。しかし、  
5 GFP-APC ( $\Delta$  TSV)、 $\Delta$  cAPC-GFP、mAPC-GFP、nAPC-GFP、n2APC-GFP は basolateral 膜への局在が著しく阻害された。このことから、APC はその C 末端の PDZ 結合モチーフ、TSV により basolateral 膜とジャンクション領域に局在すると考えられる。APC の C 末端には、basolateral 膜とジ  
10 ャンクション領域に局在する PDZ タンパク質のひとつである DLG が結合することが報告されている (Matsumine A., et. al., Science. 1996;272(5264):1020-3) ことから、APC は DLG 等の PDZ タンパク質に依存して basolateral 膜とジャンクション領域に局在していると考えられる。

15 極性化して細胞-細胞間接着を形成した A6 細胞において、nAPC-GFP はジャンクション領域への局在が検出されたが、ジャンクション領域のみならず basolateral 膜に局在し得る全長 APC とは異なる局在であり、nAPC-GFP は APC の結合タンパク質の一部のジャンクション局在タンパク質との結合のみを保持しているものと考えられる。

20 また、細胞密度が低く細胞-細胞間接着が形成されない状態で、微小管脱重合剤 (nocodazole) を添加し微小管を完全に脱重合させると、微小管上に局在していた GFP-fAPC は basal 側の細胞膜上に移行し、ストライプ状に分布し DLG と共局在した (図 6)。しかし、GFP-APC ( $\Delta$  TSV)、 $\Delta$  cAPC-GFP、mAPC-GFP、nAPC-GFP、n2APC-GFP は細胞質中に散在し、GFP-fAPC  
25 ようなストライプ状のパターンと DLG との共局在は観察されなかった。  
この結果から、APC が basal 側の細胞膜に結合するためには APC の C 末

端の PDZ 結合モチーフ、TSV に依存して DLG 等の PDZ タンパク質に結合することが必要であることが明らかになった。

〔実施例 7〕 全長 APC と変異型 APC の細胞伸展活性の解析

- 5 次に、全長 APC と変異型 APC の細胞運動に及ぼす影響を調べるため、細胞伸展アッセイを行った。トリプシン処理によりディッシュから回収したそれぞれの細胞株をカバーガラス上に撒き、15、30、60、120 分後にカバーガラスを取り出して固定し、細胞の形を可視化するためにローダミン・ファロイジンでアクチンを染色した。それぞれの試料を蛍光顕
- 10 微鏡で撮影し、ローダミン・ファロイジンで染色された細胞領域の面積を測定し、個々の細胞の面積の平均を求めてプロットした（図 7）。その結果、fAPC-GFP を発現する細胞においてのみ、細胞伸展が顕著に促進されていた。細胞伸展活性が微小管安定化によるものであるのかどうかを調べるために、次に、nocodazole を添加して微小管を脱重合された条
- 15 件下で同様のアッセイを行ったが、やはり GFP-fAPC 発現細胞のみで顕著な細胞伸展の促進が観察された。この結果から、APC は微小管安定化すること以外にも細胞伸展活性を持つが、この活性には C 末端の PDZ 結合機能が重要であることが明らかになった。〔実施例 6〕に示した APC の
- 20 局在が示すように、APC は、C 末端の PDZ 結合モチーフを介して DLG などの PDZ タンパク質に結合して basolateral 膜に局在することから、正常 APC の機能には PDZ タンパク質を介した細胞膜への局在が必要であると考えられる。変異型 APC は細胞膜に結合する機能を持たず正常な機能を発現することができず、さらにドミナント・ネガティブな効果を発揮すると考えられる。
- 25 これらの結果から、APC はその C 末端で PDZ タンパク質に結合することにより細胞膜に局在し、細胞運動の制御や細胞形態の維持に寄与して

いると考えられる。

#### 産業上の利用の可能性

- 5 本発明により、細胞の重層化を誘導し得る変異型 APC タンパク質が提供された。該タンパク質を発現する細胞は、細胞の重層化を阻害する化合物のスクリーニングに有用である。また本発明者らによって、変異型 APC を発現する細胞は細胞間接着構造を保持しているが、細胞の重層化が見られることが、初めて明らかとなった。これらの知見により、ポリープ形成および癌化のメカニズムの解明が大いに期待される。



## 請求の範囲

1. 細胞の重層化を誘導し得る機能を有することを特徴とする変異型 A P C タンパク質。
- 5 2. A P C タンパク質の少なくとも以下の (a) ~ (c) のいずれかのアミノ酸領域が欠損した、請求項 1 に記載の変異型 A P C タンパク質。
  - (a) 配列番号：1 に記載の A P C タンパク質において、2827 位の  
アミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域
  - 10 (b) 配列番号：1 に記載の A P C タンパク質において、2159 位の  
アミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域
  - (c) 配列番号：1 に記載の A P C タンパク質において、860 位のア  
ミノ酸以降の C 末端側アミノ酸領域
- 15 3. アフリカツメガエル由来である、請求項 1 または 2 に記載の変異型 A P C タンパク質。
4. 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の変異型 A P C タンパク質のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる、細胞の重層化を誘導し得る変異型 A P C タンパク質。
- 20 5. 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の変異型 A P C タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
6. 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
7. 人為的に発現させた請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の変異型 A P C タンパク質または請求項 6 に記載のベクターを有する細胞。
- 25 8. 哺乳動物由来である、請求項 7 に記載の細胞。
9. アフリカツメガエル由来である、請求項 7 に記載の細胞。

10. 樹立された細胞株である、請求項 7 ～ 9 のいずれかに記載の細胞。
11. 以下の工程 (a) ～ (c) を含む、細胞の重層化阻害剤の候補化合物のスクリーニング方法。

(a) 請求項 7 ～ 9 のいずれかに記載の細胞と被検化合物を接触さ

5 せる工程、

(b) 上記細胞の重層化を検出する工程、

(c) 重層化を阻害する化合物を選択する工程

12. 以下の工程 (a) ～ (d) を含む、細胞の重層化を誘導し得る変異型 A P C 蛋白質をコードするポリヌクレオチドをスクリーニング
- 10 する方法。

(a) アフリカツメガエル由来の細胞に、被検ポリヌクレオチドを導入して変異型 A P C 蛋白質を発現させる工程、

(b) 上記細胞を培養する工程、

(c) 上記細胞の重層化を検出する工程、

- 15 (d) 上記細胞を重層化させるポリヌクレオチドを選択する工程

図 1

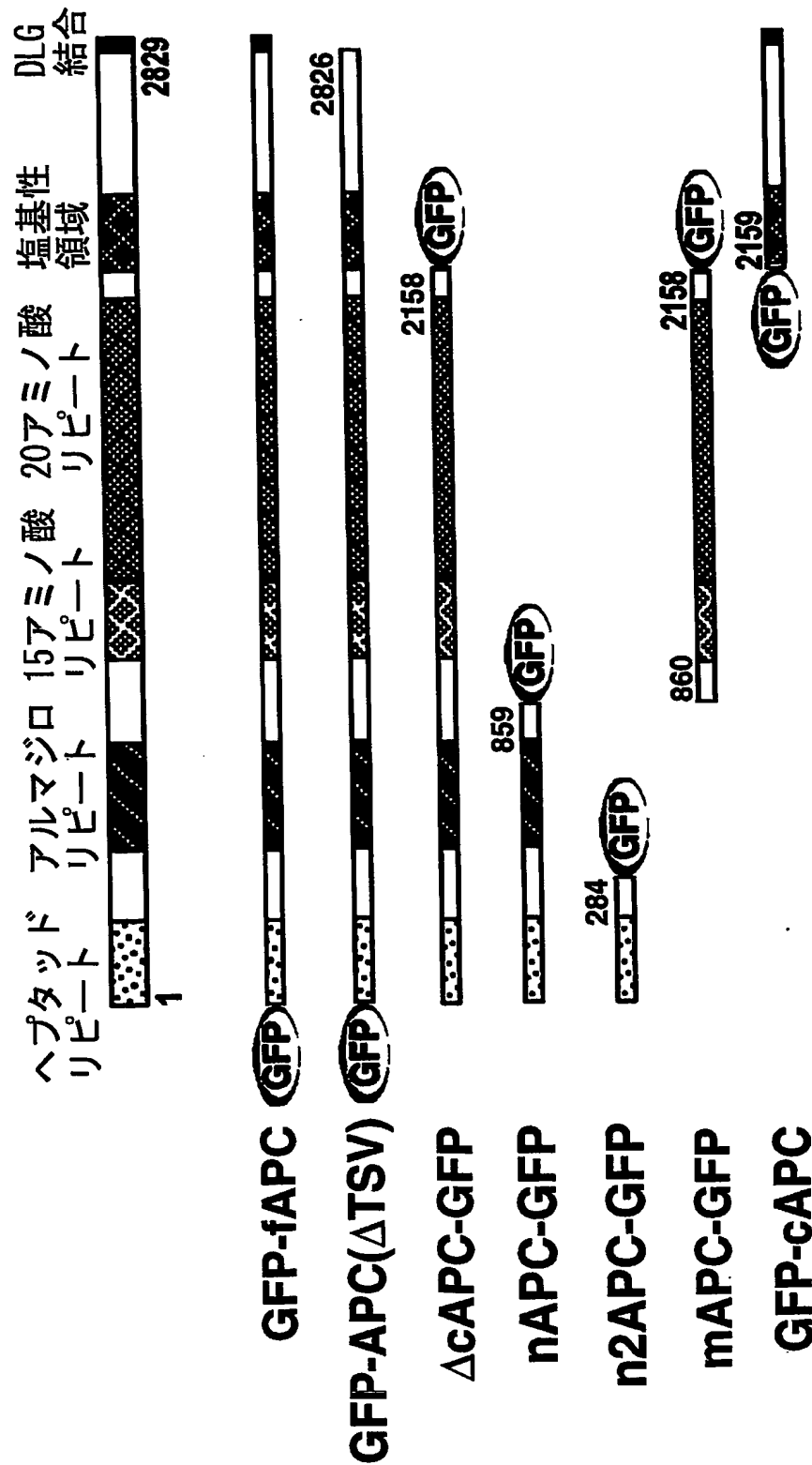
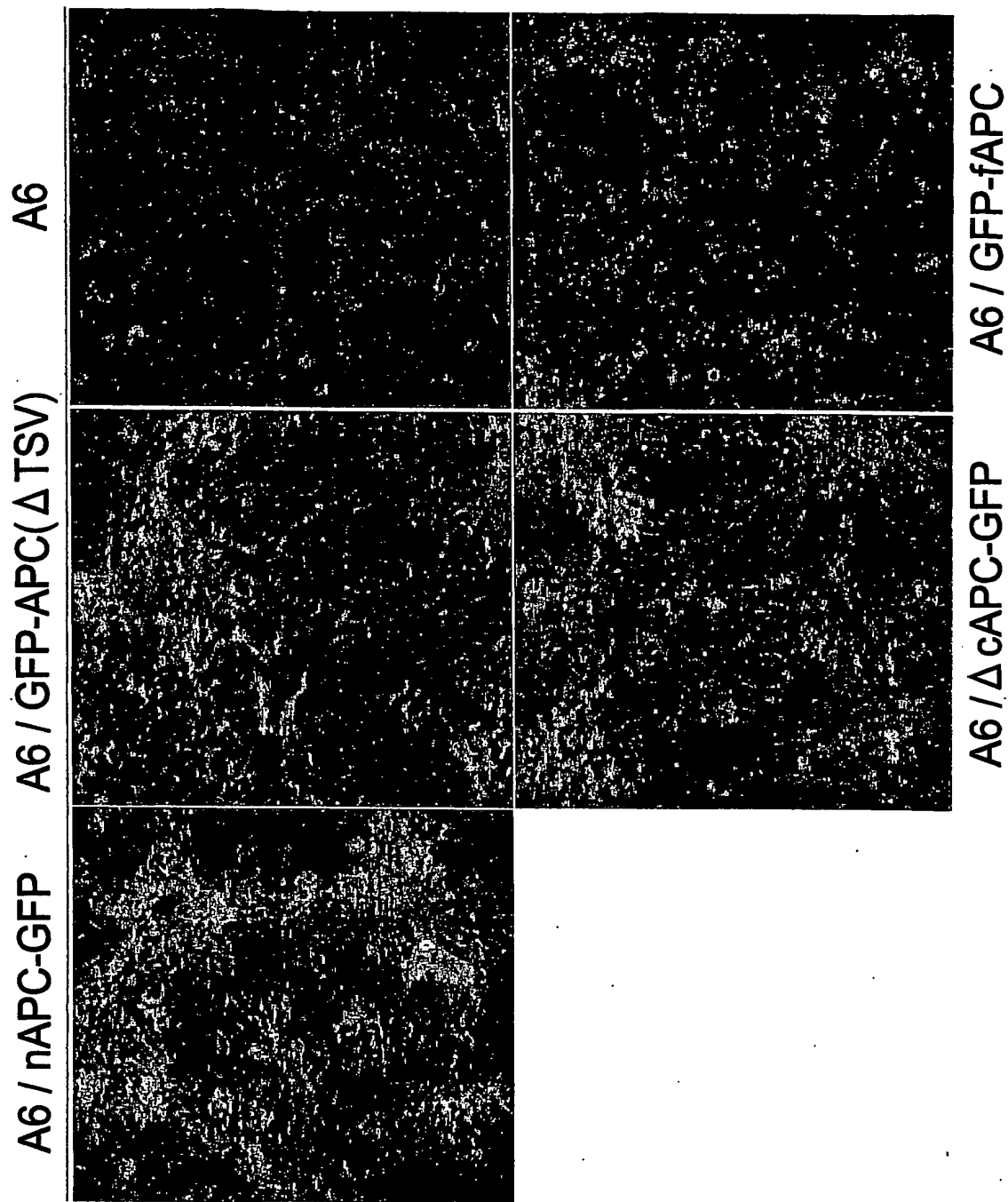


図 2

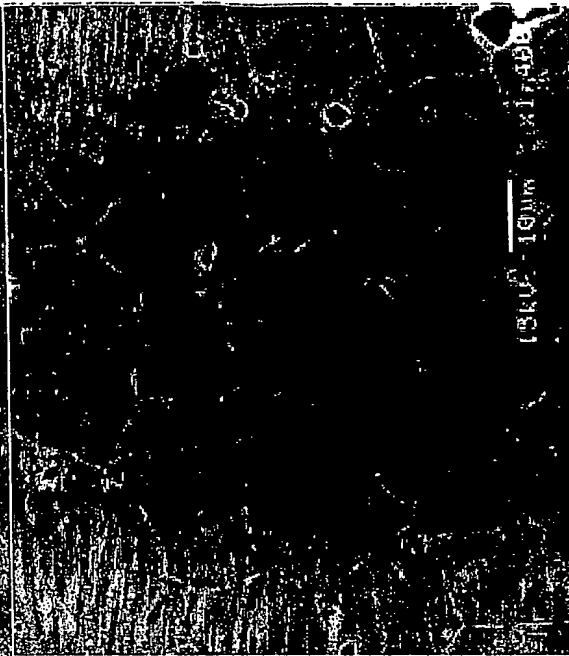
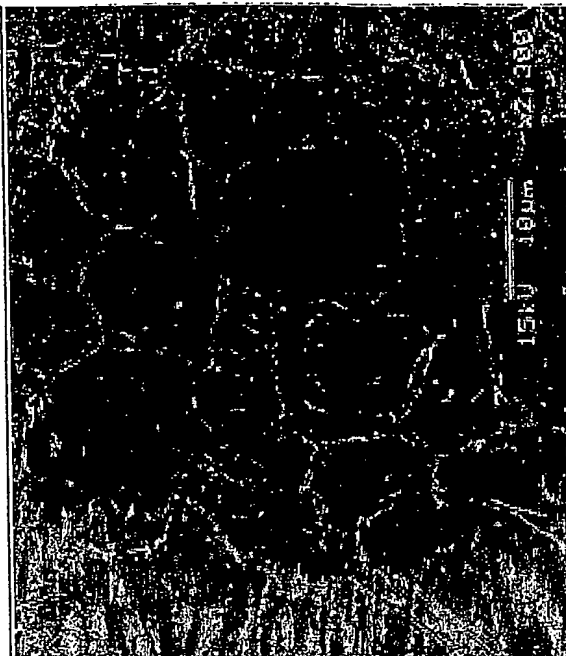


BEST AVAILABLE COPY

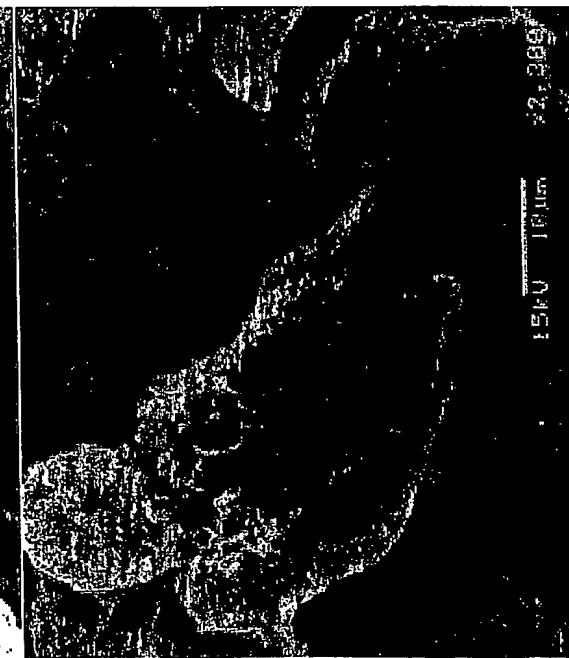
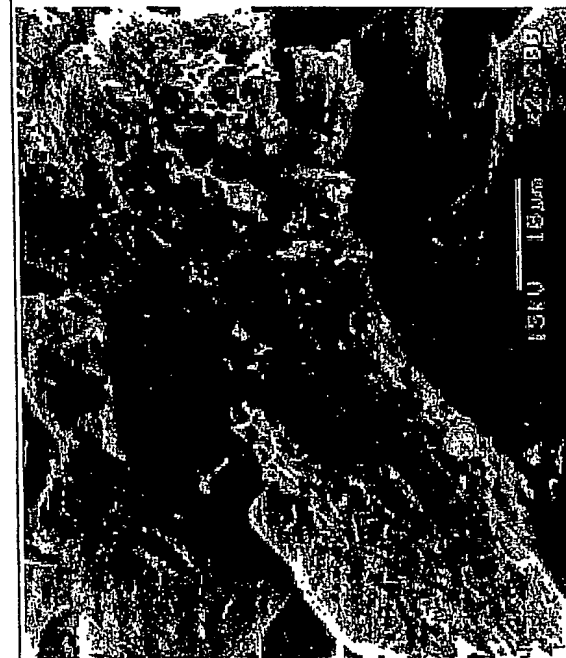
3

A6

A6 / GFP-APC( $\Delta$ TSV)



A6 / GFP-fAPC



nAPC-GFP

図 4

A6



A6 / GFP-fAPC



A6 / ΔcAPC-GFP



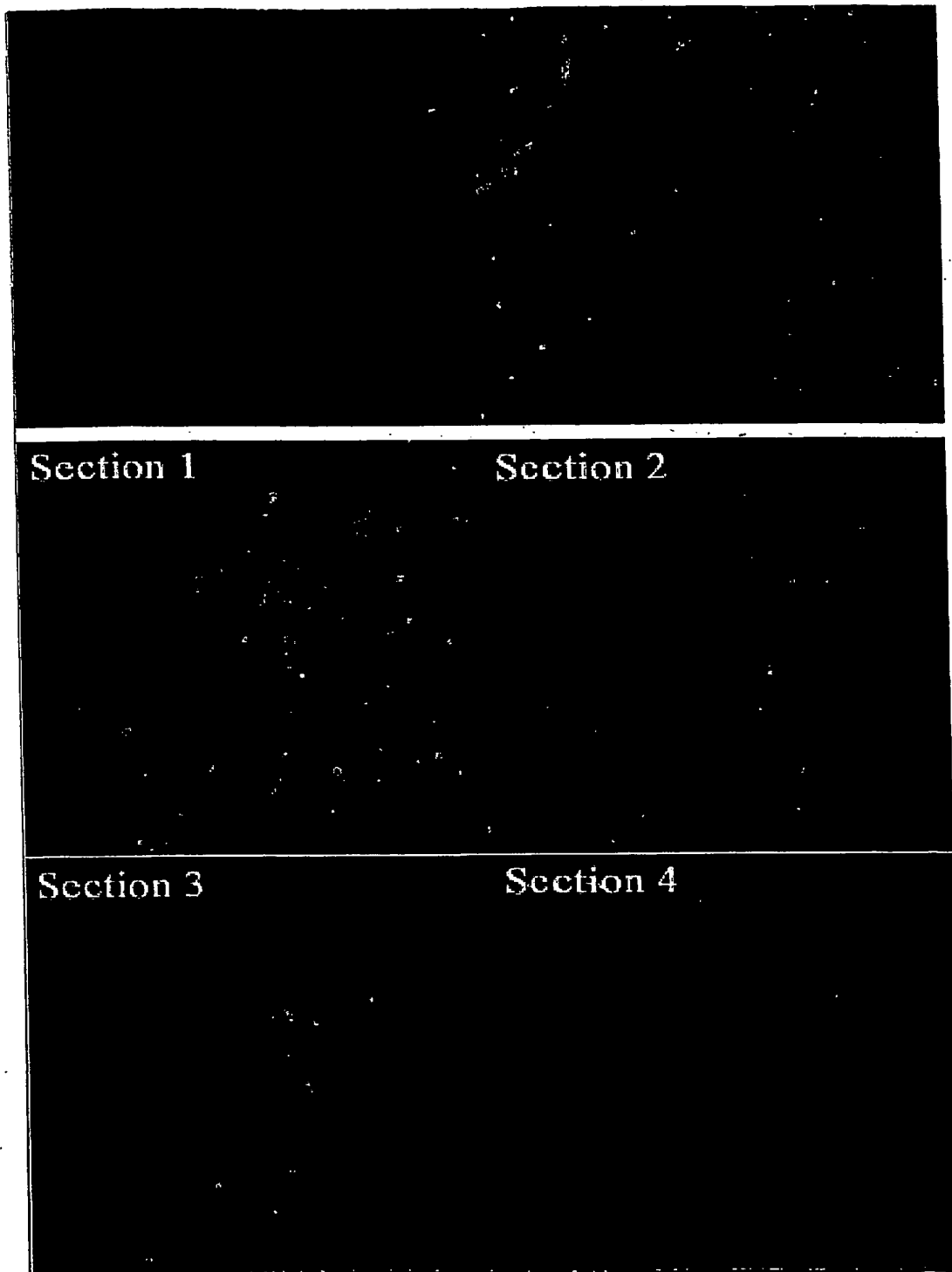
A6 / GFP-APC(ΔTSV)



図 5

parental / A6

A6 / ΔcAPC-GFP (細胞重層領域の光学切片像)



A6 / ΔcAPC-GFP

6

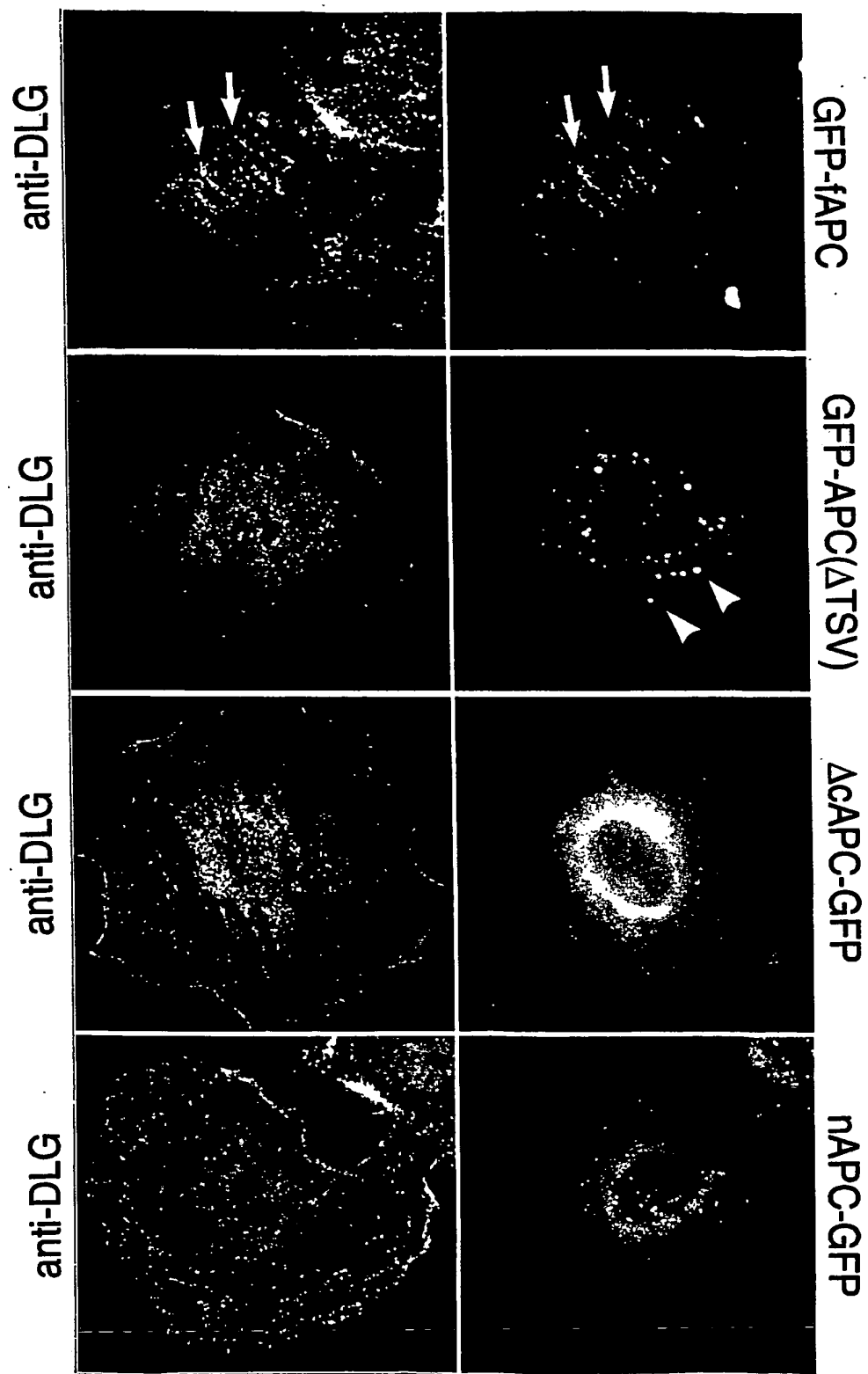
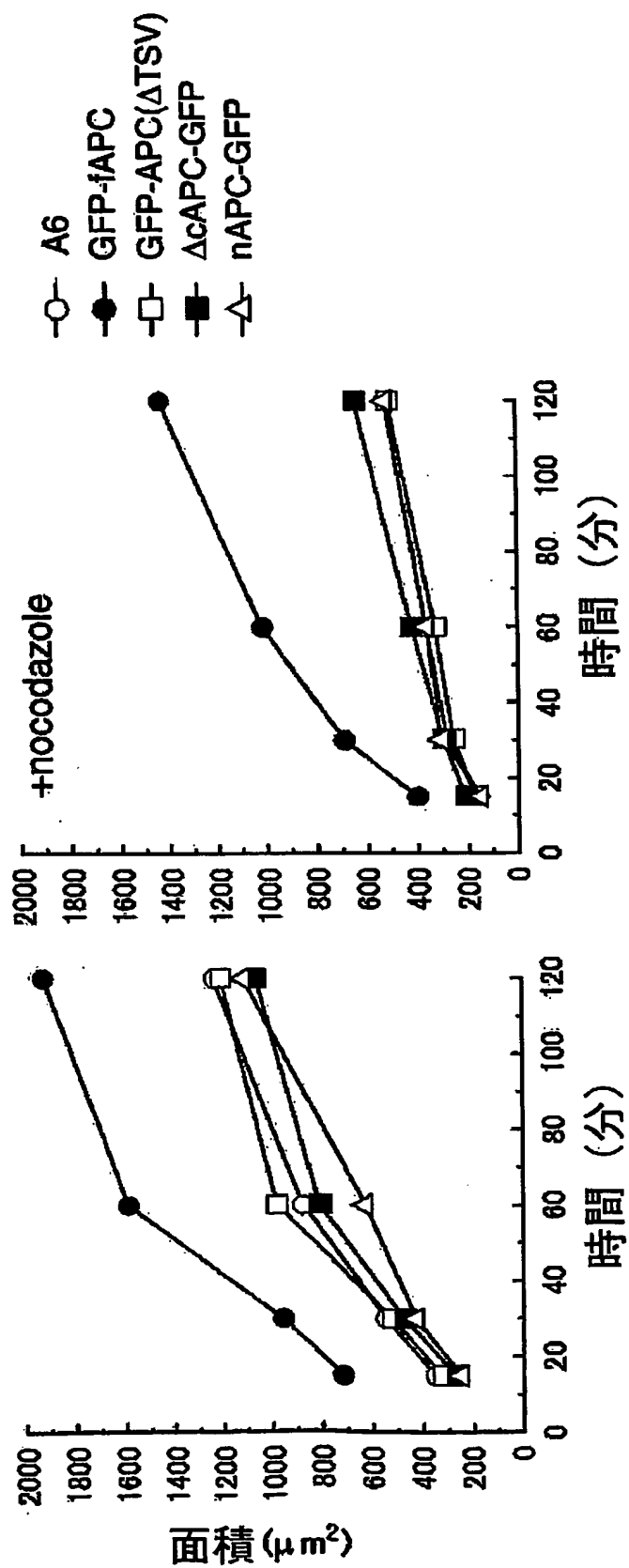




図 7



1 / 2 5

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Eisai Co., Ltd.

&lt;120&gt; Cells expressing exogenous APC mutant protein, and use thereof

&lt;130&gt; E1-A0201P

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 2002-241487

&lt;151&gt; 2002-08-22

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2829

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Xenopus laevis

&lt;400&gt; 1

Met Ala Ala Ala Ser Tyr Asp Gln Leu Val Lys Gln Val Glu Ala Leu

1

5

10

15

2 / 25

Thr Met Glu Asn Thr Asn Leu Arg Gln Glu Leu Glu Asp Asn Ser Asn

20

25

30

His Leu Thr Lys Leu Glu Thr Glu Ala Thr Asn Met Lys Glu Val Leu

35

40

45

Lys Gln Leu Gln Gly Ser Ile Glu Asp Glu Ala Met Ala Ser Ser Gly

50

55

60

Pro Ile Asp Leu Leu Glu Arg Phe Lys Asp Leu Asn Leu Asp Ser Ser

65

70

75

80

Asn Ile Pro Ala Gly Lys Ala Arg Pro Lys Met Ser Met Arg Ser Tyr

85

90

95

Gly Ser Arg Glu Gly Ser Leu Ser Gly His Ser Gly Glu Cys Ser Pro

100

105

110

Val Pro Val Gly Ser Phe Gln Arg Arg Gly Leu Leu Asn Gly Ser Arg

115

120

125

Glu Ser Ala Gly Tyr Met Glu Glu Leu Glu Lys Glu Arg Leu Leu Leu

130

135

140

Ile Ala Glu His Glu Lys Glu Glu Lys Glu Lys Arg Trp Tyr Tyr Ala

3 / 2 5

145                      150                      155                      160

Gln Leu Gln Asn Leu Thr Lys Arg Ile Asp Ser Leu Pro Leu Thr Glu

165                      170                      175

Asn Phe Ser Met Gln Thr Asp Met Thr Arg Arg Gln Leu Glu Tyr Glu

180                      185                      190

Ala Arg Gln Ile Arg Ala Ala Met Glu Glu Gln Leu Gly Thr Cys Gln

195                      200                      205

Asp Met Glu Lys Arg Val Gln Thr Arg Val Gly Lys Ile His Gln Ile

210                      215                      220

Glu Glu Glu Ile Leu Arg Ile Arg Gln Leu Leu Gln Ser Gln Val Ala

225                      230                      235                      240

Glu Ala Ala Glu Arg Thr Pro Gln Ser Lys His Asp Ala Gly Ser Arg

245                      250                      255

Asp Ala Glu Lys Leu Pro Asp Gly Gln Gly Thr Ser Glu Ile Thr Ala

260                      265                      270

Ser Gly Asn Val Gly Ser Gly Gln Gly Ser Ser Ser Arg Ala Asp His

275                      280                      285

4 / 2 5

Asp Thr Thr Ser Val Met Ser Ser Asn Ser Thr Tyr Ser Val Pro Arg

290

295

300

Arg Leu Thr Ser His Leu Gly Thr Lys Val Glu Met Val Tyr Ser Leu

305

310

315

320

Leu Ser Met Leu Gly Thr His Asp Lys Asp Asp Met Ser Arg Thr Leu

325

330

335

Leu Ala Met Ser Ser Ser Gln Asp Ser Cys Ile Ala Met Arg Gln Ser

340

345

350

Gly Cys Leu Pro Leu Leu Ile Gln Leu Leu His Gly Asn Asp Lys Asp

355

360

365

Ser Val Leu Leu Gly Asn Ser Arg Gly Ser Lys Glu Ala Arg Ala Ser

370

375

380

Gly Ser Ala Ala Leu Asp Asn Ile Ile His Ser Gln Pro Asp Asp Lys

385

390

395

400

Arg Gly Arg Arg Glu Ile Arg Val Leu His Leu Leu Glu Gln Ile Arg

405

410

415

Ala Tyr Cys Glu Thr Cys Trp Glu Trp Gln Glu Ala His Glu Gln Gly

420

425

430

5 / 25

Met Asp Gln Asp Lys Asn Pro Met Pro Ala Pro Val Asp His Gln Ile

435

440

445

Cys Pro Ala Val Cys Val Leu Met Lys Leu Ser Phe Asp Glu Glu His

450

455

460

Arg His Ala Met Asn Glu Leu Gly Gly Leu Gln Ala Ile Ala Glu Leu

465

470

475

480

Leu Gln Val Asp Cys Glu Met Tyr Gly Leu Ile Asn Asp His Tyr Ser

485

490

495

Val Thr Leu Arg Arg Tyr Ala Gly Met Ala Leu Thr Asn Leu Thr Phe

500

505

510

Gly Asp Val Ala Asn Lys Ala Thr Leu Cys Ser Met Lys Ser Cys Met

515

520

525

Arg Ala Leu Val Ala Gln Leu Lys Ser Glu Ser Glu Asp Leu Gln Gln

530

535

540

Val Ile Ala Ser Val Leu Arg Asn Leu Ser Trp Arg Ala Asp Val Asn

545

550

555

560

Ser Lys Lys Thr Leu Arg Glu Val Gly Ser Val Lys Ala Leu Met Glu

6 / 2 5

565

570

575

Cys Ala Leu Asp Val Lys Lys Glu Ser Thr Leu Lys Ser Val Leu Ser

580

585

590

Ala Leu Trp Asn Leu Ser Ala His Cys Thr Glu Asn Lys Ala Asp Ile

595

600

605

Cys Ser Val Asp Gly Ala Leu Ala Phe Leu Val Ser Thr Leu Thr Tyr

610

615

620

Arg Ser Gln Thr Asn Thr Leu Ala Ile Ile Glu Ser Gly Gly Gly Ile

625

630

635

640

Leu Arg Asn Val Ser Ser Leu Ile Ala Thr Asn Glu Asp His Arg Gln

645

650

655

Ile Leu Arg Glu Asn Asn Cys Leu Gln Thr Leu Leu Gln His Leu Lys

660

665

670

Ser His Ser Leu Thr Ile Val Ser Asn Ala Cys Gly Thr Leu Trp Asn

675

680

685

Leu Ser Ala Arg Asn Ala Lys Asp Gln Glu Gly Leu Trp Asp Met Gly

690

695

700

7 / 2 5

Ala Val Ser Met Leu Lys Asn Leu Ile His Ser Lys His Lys Met Ile

705

710

715

720

Ala Met Gly Ser Ala Ala Ala Leu Arg Asn Leu Met Ala Asn Arg Pro

725

730

735

Ala Lys Tyr Lys Asp Ala Asn Ile Met Ser Pro Gly Ser Ser Val Pro

740

745

750

Ser Leu His Val Arg Lys Gln Lys Ala Leu Glu Ala Glu Leu Asp Ala

755

760

765

Gln His Leu Ser Glu Thr Phe Asp Asn Ile Asp Asn Leu Ser Pro Lys

770

775

780

Thr Thr His Arg Asn Lys Gln Arg His Lys Gln Asn Leu Cys Ser Glu

785

790

795

800

Tyr Ala Leu Asp Ser Ser Arg His Asp Asp Ser Ile Cys Arg Ser Asp

805

810

815

Asn Phe Ser Ile Gly Asn Leu Thr Val Leu Ser Pro Tyr Ile Asn Thr

820

825

830

Thr Val Leu Pro Gly Ser Ser Ser Pro Arg Pro Thr Met Asp Gly Ser

835

840

845



8 / 25

Arg Pro Glu Lys Asp Arg Glu Arg Thr Ala Gly Leu Gly Asn Tyr His

850

855

860

Ser Thr Thr Glu Ser Ser Gly Asn Ser Ser Lys Arg Ile Gly Ile Gln

865

870

875

880

Leu Ser Thr Thr Ala Gln Ile Ser Lys Val Met Asp Glu Val Ser Asn

885

890

895

Ile His Leu Val Gln Glu Asn Arg Ser Ser Gly Ser Ala Ser Glu Met

900

905

910

His Cys Met Ser Asp Glu Arg Asn Ser Gln Arg Lys Pro Ser Ser Asn

915

920

925

His Pro Gln Ser Asn Pro Phe Thr Phe Thr Lys Ala Glu Ser Ser Thr

930

935

940

Arg Gly Cys Pro Val Ala Phe Met Lys Met Glu Tyr Lys Met Ala Ser

945

950

955

960

Asn Asp Ser Leu Asn Ser Val Ser Ser Thr Glu Gly Tyr Gly Lys Arg

965

970

975

Gly Gln Val Lys Pro Ser Val Glu Ser Tyr Ser Glu Asp Asp Glu Ser

9 / 25

980

985

990

Lys Phe Phe Ser Tyr Gly Gln Tyr Pro Ala Gly Leu Ala His Lys Ile

995

1000

1005

Gln Ser Ala Asn His Met Asp Asp Asn Asp Thr Glu Leu Asp Thr Pro

1010

1015

1020

Ile Asn Tyr Ser Leu Lys Tyr Ser Asp Glu Gln Leu Asn Ser Gly Arg

1025

1030

1035

1040

Gln Ser Pro Thr Gln Asn Glu Arg Trp Ser Arg Pro Lys His Ile Ile

1045

1050

1055

Asp Ser Glu Met Lys Gln Ser Glu Gln Arg Gln Pro Arg Thr Thr Lys

1060

1065

1070

Thr Thr Tyr Ser Ser Tyr Thr Glu Asn Lys Glu Glu Lys His Lys Lys

1075

1080

1085

Phe Pro Pro His Phe Asn Gln Ser Glu Asn Val Pro Ala Tyr Thr Arg

1090

1095

1100

Ser Arg Gly Ala Asn Asn Gln Val Asp Gln Ser Arg Val Ser Ser Asn

1105

1110

1115

1120

1 0 / 2 5

Leu Ser Asn Asn Ser Lys Ala Ser Lys Pro His Cys Gln Val Asp Asp

1125

1130

1135

Tyr Asp Asp Asp Lys Thr Thr Asn Phe Ser Glu Arg Tyr Ser Glu Glu

1140

1145

1150

Glu Gln Gln Glu Asp Glu Thr Glu Arg Gln Asn Lys Tyr Asn Ile Lys

1155

1160

1165

Ala Tyr Ala Ser Glu Glu His His Gly Glu Gln Pro Ile Asp Tyr Ser

1170

1175

1180

Arg Lys Tyr Ser Thr Asp Val Pro Ser Ser Ala Gln Lys Pro Ser Phe

1185

1190

1195

1200

Pro Tyr Ser Asn Asn Ser Ser Lys Gln Lys Pro Lys Lys Glu Gln Val

1205

1210

1215

Ser Ser Asn Ser Asn Thr Pro Thr Pro Ser Pro Asn Ser Asn Arg Gln

1220

1225

1230

Asn Gln Leu His Pro Asn Ser Ala Gln Ser Arg Pro Gly Leu Asn Arg

1235

1240

1245

Pro Lys Gln Ile Pro Asn Lys Pro Pro Ser Ile Asn Gln Glu Thr Ile

1250

1255

1260

1 1 / 2 5

Gln Thr Tyr Cys Val Glu Asp Thr Pro Ile Cys Phe Ser Arg Gly Ser  
1265 1270 1275 1280

Ser Leu Ser Ser Leu Ser Ser Ala Glu Asp Glu Ile Glu Gly Arg Glu  
1285 1290 1295

Arg Asn Ser Arg Gly Gln Glu Ser Asn Asn Thr Leu Gln Ile Thr Glu  
1300 1305 1310

Pro Lys Glu Ile Ser Ala Val Ser Lys Asp Gly Ala Val Asn Glu Thr  
1315 1320 1325

Arg Ser Ser Val His His Thr Arg Thr Lys Asn Asn Arg Leu Gln Thr  
1330 1335 1340

Ser Asn Ile Ser Pro Ser Asp Ser Ser Arg His Lys Ser Val Glu Phe  
1345 1350 1355 1360

Ser Ser Gly Ala Lys Ser Pro Ser Lys Ser Gly Ala Gln Thr Pro Lys  
1365 1370 1375

Ser Pro Pro Glu His Tyr Val Gln Glu Thr Pro Leu Met Phe Ser Arg  
1380 1385 1390

Cys Thr Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Glu Ser His Ser Ile Ala

1 2 / 2 5

1395

1400

1405

Ser Ser Ile Ala Ser Ser Val Ala Ser Glu His Met Ile Ser Gly Ile

1410

1415

1420

Ile Ser Pro Ser Asp Leu Pro Asp Ser Pro Gly Gln Thr Met Pro Pro

1425

1430

1435

1440

Ser Arg Ser Lys Thr Pro Pro Pro Pro Gln Thr Val Gln Ala Lys Lys

1445

1450

1455

Asp Gly Ser Lys Pro Ile Val Pro Asp Glu Glu Arg Gly Lys Val Ala

1460

1465

1470

Lys Thr Ala Val His Ser Ala Ile Gln Arg Val Gln Val Leu Gln Glu

1475

1480

1485

Ala Asp Thr Leu Leu His Phe Ala Thr Glu Ser Thr Pro Asp Gly Phe

1490

1495

1500

Ser Cys Ala Ser Ser Leu Ser Ala Leu Ser Leu Asp Glu Pro Tyr Ile

1505

1510

1515

1520

Gln Lys Asp Val Gln Leu Lys Ile Met Pro Pro Val Leu Glu Asn Asp

1525

1530

1535

1 3 / 2 5

Gln Gly Asn Lys Ala Glu Pro Glu Lys Glu Phe Ile Asp Asn Lys Ala

1540

1545

1550

Lys Lys Glu Asp Lys Arg Ser Glu Gln Glu Lys Asp Met Leu Asp Asp

1555

1560

1565

Thr Asp Asp Asp Ile Asp Ile Leu Glu Glu Cys Ile Ile Ser Ala Met

1570

1575

1580

Pro Arg Lys Pro Ser Arg Lys Asn Lys Lys Val Pro Gln Pro Thr Pro

1585

1590

1595

1600

Gly Lys Pro Pro Pro Pro Val Ala Arg Lys Pro Ser Gln Leu Pro Val

1605

1610

1615

Tyr Lys Leu Leu Ser Ser Gln Asn Arg Leu Gln Thr Gln Lys His Val

1620

1625

1630

Asn Phe Thr His Ser Asp Asp Met Pro Arg Val Tyr Cys Val Glu Gly

1635

1640

1645

Thr Pro Ile Asn Phe Ser Thr Ala Thr Ser Leu Ser Asp Leu Thr Ile

1650

1655

1660

Glu Ser Pro Pro Ser Glu Pro Thr Asn Asp Gln Pro Asn Thr Asp Ser

1665

1670

1675

1680

1 4 / 2 5

Leu Ser Thr Asp Leu Glu Lys Arg Asp Thr Ile Pro Thr Glu Gly Arg

1685

1690

1695

Ser Thr Asp Asp Thr Asp Ala Ser Lys Pro Leu Asn Pro Thr Thr Val

1700

1705

1710

Leu Asp Glu Asp Lys Ala Glu Glu Gly Asp Ile Leu Ala Glu Cys Ile

1715

1720

1725

His Ser Ala Met Pro Lys Gly Lys Ser His Lys Pro Tyr Arg Val Lys

1730

1735

1740

Lys Ile Met Asp Gln Ile Asn His Thr Ser Ala Ala Thr Ser Ser Gly

1745

1750

1755

1760

Asn Ser Arg Ser Met Gln Glu Thr Asp Lys Asn Lys Pro Thr Ser Pro

1765

1770

1775

Val Lys Pro Met Pro Gln Ser Ile Gly Phe Lys Glu Arg Leu Lys Lys

1780

1785

1790

Asn Thr Glu Leu Lys Leu Asn Pro Asn Ser Glu Asn Gln Tyr Cys Asp

1795

1800

1805

Pro Arg Lys Pro Ser Ser Lys Lys Pro Ser Lys Val Ala Asn Glu Lys

1 5 / 2 5

1810

1815

1820

Ile Pro Asn Asn Glu Glu Arg Thr Lys Gly Phe Ala Phe Asp Ser Pro

1825

1830

1835

1840

His His Tyr Thr Pro Ile Glu Gly Thr Pro Tyr Cys Phe Ser Arg Asn

1845

1850

1855

Asp Ser Leu Ser Ser Leu Asp Phe Glu Asp Asp Asp Ile Asp Leu Ser

1860

1865

1870

Lys Glu Lys Ala Glu Leu Arg Lys Glu Lys Gly Thr Lys Asp Thr Asp

1875

1880

1885

Gln Lys Val Lys Tyr Lys His Glu Asn Arg Ala Ile Asn Pro Met Gly

1890

1895

1900

Lys Gln Asp Gln Thr Gly Pro Lys Ser Leu Gly Gly Arg Asp Gln Pro

1905

1910

1915

1920

Lys Ala Leu Val Gln Lys Pro Thr Ser Phe Ser Ser Ala Ala Lys Gly

1925

1930

1935

Thr Gln Asp Arg Gly Gly Ala Thr Asp Glu Lys Met Glu Asn Phe Ala

1940

1945

1950



1 6 / 2 5

Ile Glu Asn Thr Pro Val Cys Phe Ser Arg Asn Ser Ser Leu Ser Ser

1955

1960

1965

Leu Ser Asp Ile Asp Gln Glu Asn Asn Asn Lys Glu Thr Glu Pro Leu

1970

1975

1980

Lys Gln Thr Gly Thr Ser Glu Thr Gln Leu Gly Leu Arg Arg Pro Gln

1985

1990

1995

2000

Thr Ser Gly Tyr Ala Pro Lys Ser Phe His Val Glu Asp Thr Pro Val

2005

2010

2015

Cys Phe Ser Arg Asn Ser Ser Leu Ser Ser Leu Ser Ile Asp Ser Glu

2020

2025

2030

Asp Asp Leu Leu Gln Glu Cys Ile Ser Ser Ala Met Pro Lys Lys Arg

2035

2040

2045

Lys Pro Ser Lys Ile Lys Asn Glu Val Gly Lys Ser Arg Ser Asn Ser

2050

2055

2060

Val Gly Gly Ile Leu Ala Glu Glu Pro Asp Leu Thr Leu Asp Leu Arg

2065

2070

2075

2080

Asp Ile Gln Ser Pro Asp Ser Glu Asn Ala Phe Ser Pro Asp Ser Glu

2085

2090

2095

17 / 25

Asn Phe Asp Trp Lys Ala Ile Gln Glu Gly Ala Asn Ser Ile Val Ser

2100

2105

2110

Arg Leu His Gln Ala Ala Ala Ala Gly Ser Leu Ser Arg Gln Gly Ser

2115

2120

2125

Ser Asp Ser Asp Ser Ile Leu Ser Leu Lys Ser Gly Ile Ser Leu Gly

2130

2135

2140

Ser Pro Phe His Leu Thr Leu Asp Lys Glu Glu Lys Thr Ile Thr Ser

2145

2150

2155

2160

Asn Lys Gly Pro Lys Ile Leu Lys Pro Ala Glu Lys Ser Ala Leu Glu

2165

2170

2175

Asn Lys Lys Thr Glu Glu Glu Pro Lys Gly Ile Lys Gly Gly Lys Lys

2180

2185

2190

Val Tyr Lys Ser Leu Ile Thr Gly Lys Ser Arg Ser Ser Ser Asp Phe

2195

2200

2205

Ser Ser His Cys Lys Gln Ser Val Gln Thr Asn Met Pro Ser Ile Ser

2210

2215

2220

Arg Gly Arg Thr Met Ile His Ile Pro Gly Val Arg Ala Ser Ser Pro

1 8 / 2 5

2225                      2230                      2235                      2240

Ser Thr Ser Pro Val Ser Lys Lys Gly Pro Val Phe Lys Asn Val Pro

2245

2250

2255

Ser Lys Gly Ser Asn Glu Asn Pro Ser Ser Ser Ser Ser Pro Lys Gly

2260

2265

2270

Thr Lys Pro Leu Lys Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ser Arg Pro Ser Ser

2275

2280

2285

Thr Pro Gly Gly Ser Ser Lys Gly Asn Ser Arg Ser Gly Ser Arg Asp

2290

2295

2300

Ser Ala Ser Ser Arg Pro Ser Pro Gln Pro Leu Ser Arg Pro Leu Gln

2305

2310

2315

2320

Ser Pro Gly Arg Asn Ser Ile Ser Pro Gly Lys Asn Gly Ile Ser Pro

2325

2330

2335

Pro Asn Lys Phe Ser Gln Leu Pro Arg Thr Thr Ser Pro Ser Thr Ala

2340

2345

2350

Ser Thr Lys Ser Ser Gly Ser Gly Arg Met Ser Tyr Thr Ser Pro Gly

2355

2360

2365

19 / 25

Arg Gln Leu Ser Gln Pro Asn Leu Ser Lys Gln Ser Gly Leu Pro Lys

2370

2375

2380

Thr His Ser Ser Ile Pro Arg Ser Glu Ser Ala Ser Lys Ser Leu Asn

2385

2390

2395

2400

Gln Asn Val Asn Thr Gly Ser Asn Lys Lys Val Glu Leu Ser Arg Met

2405

2410

2415

Ser Ser Thr Lys Ser Ser Gly Ser Glu Ser Asp Arg Ser Glu Arg Pro

2420

2425

2430

Ala Leu Val Arg Gln Ser Thr Phe Ile Lys Glu Ala Pro Ser Pro Thr

2435

2440

2445

Leu Arg Arg Lys Leu Glu Glu Ser Ala Ser Phe Glu Ser Leu Ser Ser

2450

2455

2460

Ser Ser Arg Ala Asp Ser Pro Pro Arg Ser Gln Thr Gln Thr Pro Ala

2465

2470

2475

2480

Leu Ser Pro Ser Leu Pro Asp Met Ala Leu Ser Thr His Ser Ile Gln

2485

2490

2495

Ala Gly Gly Trp Arg Lys Met Pro Pro Asn Leu Asn Pro Ala Ala Glu

2500

2505

2510

20 / 25

His Gly Asp Ser Arg Arg Arg His Asp Ile Ser Arg Ser His Ser Glu

2515

2520

2525

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Ile Thr Arg Ser Gly Thr Trp Lys Arg Glu

2530

2535

2540

His Ser Lys His Ser Ser Ser Leu Pro Arg Val Ser Thr Trp Arg Arg

2545

2550

2555

2560

Thr Gly Ser Ser Ser Ser Ile Leu Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Glu

2565

2570

2575

Lys Ala Lys Ser Glu Asp Glu Lys Gln Gln Val Cys Ser Phe Pro Gly

2580

2585

2590

Pro Arg Ser Glu Cys Ser Ser Ser Ala Lys Gly Thr Trp Arg Lys Ile

2595

2600

2605

Lys Glu Ser Glu Ile Leu Glu Thr Pro Ser Asn Gly Ser Ser Ser Thr

2610

2615

2620

Ile Ala Glu Ser Asn Cys Ser Leu Glu Ser Lys Thr Leu Val Tyr Gln

2625

2630

2635

2640

Met Ala Pro Ala Val Ser Lys Thr Glu Asp Val Trp Val Arg Ile Glu

21 / 25

2645

2650

2655

Asp Cys Pro Ile Asn Asn Pro Arg Ser Gly Arg Ser Pro Thr Gly Asn

2660

2665

2670

Ser Pro Pro Val Ile Asp Asn Val Leu Asp Gln Gly Gln Lys Glu Glu

2675

2680

2685

Ala Ala Lys Asp Cys His Thr Arg His Asn Ser Gly Asn Gly Asn Val

2690

2695

2700

Pro Leu Leu Glu Asn Arg Gln Lys Ser Phe Ile Lys Val Asp Gly Leu

2705

2710

2715

2720

Asp Thr Lys Gly Thr Asp Pro Lys Ser Leu Ile Asn Asn Gln Gln Glu

2725

2730

2735

Thr Asn Glu Asn Thr Val Ala Glu Arg Thr Ala Phe Ser Ser Ser Ser

2740

2745

2750

Ser Ser Lys His Ser Ser Pro Ser Gly Thr Val Ala Ala Arg Val Thr

2755

2760

2765

Pro Phe Asn Tyr Asn Pro Ser Pro Arg Lys Ser Asn Gly Glu Asn Ser

2770

2775

2780

22 / 25

Thr Ser Arg Pro Ser Gln Ile Pro Thr Pro Val Thr Asn Ser Thr Lys

2785

2790

2795

2800

Lys Arg Asp Ser Lys Thr Glu Thr Thr Asp Ser Ser Gly Ser Gln Ser

2805

2810

2815

Pro Lys Arg His Ser Gly Ser Tyr Leu Val Thr Ser Val

2820

2825

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 2

cgacgcgtaa tgcattttct ccagactctg

30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

23 / 25

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 3

ggaattcgga tcctcacacc agataagaac cagagtgcc

39

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 4

cgacgcgtat ggctgctgct tcgtatgata agt

33

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;



2 4 / 2 5

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 5

cgacgcgtac ctgctgttct ticcctgtc

29

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ctagctagca tggctgctgc ttcgtatg

28

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

2 5 / 2 5

&lt;400&gt; 7

cctgtcccaa gtaggtcacg atcgatc

27

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

ctagctagcc tcggcaacta ccattcg

27

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

attagagctc actctagac

19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10434

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/46, C12N5/10, C12Q1/02, 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12-15/90, C07K14/46, C12N5/10, C12Q1/02, 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIMORI-KIYOSUE Y. et al., Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells., J.Cell Biol., 07 February, 2000 (07.02.00), Vol.148, No.3, p.505-18	1-10
Y		1-12
Y	JUWANA JP. et al., EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins., Int.J.Cancer, 12 April, 1999 (12.04.99), Vol.81, No.2, p.275-84, Abstract	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 07 November, 2003 (07.11.03)

Date of mailing of the international search report  
 25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/46, C12N5/10, C12Q1/02, 1/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12-15/90, C07K14/46, C12N5/10, C12Q1/02, 1/68

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 MEDLINE(STN) BIOSIS(STN) WPIDS(STN) JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MIMORI-KIYOSUE Y et al., Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtu	1-10
Y	bules and concentrates at their growing ends in epithelial c ells., J. Cell Biol. 2000 Feb 7, Vol. 148, No. 3, p. 505-18	1-12
Y	JUWANA JP et al., EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins., Int. J. Cancer, 1999 Apr 12, Vol. 81, No. 2, p. 275-84, Abstract	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.11.03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号 100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

印

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488